ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 23, 2, 1989

УДК 576.895.421.542.74

ДЕЙСТВИЕ УГЛЕКИСЛОГО ГАЗА В ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ НА ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ

Р. Л. Наумов, В. П. Гутова

Клещей *Ixodes persulcatus, Dermacentor reticulatus, D. marginatus* подвергали воздействию углекислого газа в концентрациях 50, 70, 80 и 90 % при температуре от 18 до 26 °С. Анестезия наступала тем быстрее и была тем глубже, чем выше была концентрация газа и ниже температура. В дополнительных опытах показано, что характер реакции на CO_2 зависит от уровня водного баланса, определяющего положение атриальных клапанов. Реакция отдельных особей на CO_2 не строго индивидуальна, а может меняться в зависимости от состояния клеща в момент опыта.

Широко известно, что углекислота используется в лабораторных экспериментах как щадящее средство при обездвиживании насекомых. Сравнительно недавно было показано, что комары 4 видов, зараженные в эксперименте вирусом калифорнийского энцефалита, после анестезии углекислотой значительно дольше, чем незараженные, остаются неспособными к полету (Turrell, Hardy, 1980). Если установленное этими авторами явление характерно и для других групп переносчиков при естественном заражении возбудителями, это сулит громадную экономию сил и средств при организации вирусологических исследований. Зараженность комаров и клещей вирусами обычно не превышает единиц процентов. Предварительный отбор членистоногих, подозреваемых на зараженность и подлежащих исследованию, в десятки раз сократил бы объем вирусологических работ. Это побудило нас провести эксперименты по воздействию CO_2 на клещей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Опыты проведены с 1413 особями клещей 3 видов из Жигулевского заповедника. Число клещей в каждом варианте опытов приведено в тексте и на рисунках. Нимф и имаго *Dermacentor reticulatus* Fabr. из первого поколения лабораторной культуры (F_1) брали через 1.5—3 недели после линьки, нимф таежного клеща (*Ixodes persulcatus* Schulze) — через 3—4 недели после линьки до «зимовки» или через неделю после 1—2-месячной «зимовки» в холодильнике.

Эксперименты с природными *Dermacentor marginatus* Sulz и *D. reticulatus* проводили в стационарной лаборатории через 2—4 мес. после сбора клещей в природе. До опыта клещей содержали в холодильнике. Эксперименты с имаго таежного клеща проводили в полевой лаборатории на 2—3-й день после сбора клещей в природе.

Для опытов использовали углекислоту из баллончиков для бытовых сифонов. Шланг от кислородной подушки одевали на горловину баллончика и придерживали рукой в рукавице. Тонким шилом сквозь шланг прокалывали пробку баллончика и постепенно выпускали газ в подушку. Клещей по одному помещали в шприц объемом 1 мл, поршнем выжимали излишки воздуха, а затем из шланга, соединенного с кислородной подушкой, набирали в шприц нужное количество углекислого газа. Эта техника позволяла получать в камере шприца углекислый газ заданной концентрации и вести наблюдения за поведением клеща. За несколько секунд до истечения срока наблюдений движением поршня выгоняли из шприца углекислоту, а затем резким движением вынимали поршень из баллона. Таким образом добивались быстрой смены углекислого газа, находившегося в камере шприца, на свежий воздух. Экспозиция в углекислоте во всех случаях 10 мин. Опыты проводили при естественной температуре лаборатории.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клещи, оказавшиеся в атмосфере углекислоты, показали целую гамму вариантов поведения. Но для удобства анализа материала мы выделяем 2 основных типа — активное и неактивное состояния и по 2 подтипа в каждом из них. Активное состояние включает: 1.1 — перемещение клеща по камере шприца (часто чрезвычайно медленное) и 1.2 — пребывание клеща на одном месте. В последнем случае клещ, сидящий на стенке камеры или лежащий на спине, периодически двигает одной или несколькими ногами, но эти движения не похожи на попытку продвинуться по стеклу или перевернуться со спины. Состояния 1.1 и 1.2 могут неоднократно сменять друг друга.

Неактивное состояние включает: 2.1 — состояние неподвижности, при котором клещ остается сидеть на стенке камеры шприца и 2.2 — состояние глубокой анестезии. При состоянии 2.1 легкий подогрев на руке в течение 5—15 сек стимулирует начало активности, т. е. переход в состояние 1.2 или даже 1.1. После прекращения действия CO_2 клещ сразу начинает двигаться. В состоянии глубокой анестезии клещ обычно лежит на спине и не реагирует на тепловое воздействие. По окончании действия CO_2 клещ начинает движение спустя несколько секунд (обычно 3—20).

В зависимости от условий эксперимента, а также в результате индивидуальных особенностей особей мы наблюдали разные варианты реакции клещей на CO_2. Наиболее часто встречались следующие: 1) перемещение 1.1 в течение всего срока наблюдений; 2) многократный переход от состояния 1.1 к 1.2 и обратно; 3) последовательный переход из состояния 1.1 в 1.2, 2.1 и 2.2 и пребывание в последнем состоянии до конца срока наблюдений; любое из перечисленных состояний может отсутствовать; 4) смена, иногда многократная, состояний активности и неактивности: 1.1—1.2—2.1(2.2)—1.2—1.1 и т. д.

Учитывая особенности реакции клещей на CO_2, отличные от реакции насекомых, мы использовали следующие параметры для описания поведения клещей: общая длительность периода активности (состояния 1.1+1.2); общая длительность периода перемещений (состояние 1.1); время до наступления первого состояния неактивности (если клещ активен весь срок наблюдений, это время приравнивали к 600 сек); время выхода из анестезии (время от конца экспозиции в атмосфере CO_2 до начала движения клеща). Для клещей рода *Dermacentor* часто «притворяющихся» (т. е. демонстрирующих неподвижность с согнутыми и поджатыми под вентральную сторону тела ногами) этот признак непригоден.

Ixodes persulcatus, имаго из природы. Результаты хронометража поведения 427 самцов и самок таежного клеща из природы представлены на рис. 1 и 2. Было выяснено, что при 50 % CO_2 самки остаются активны половину срока наблюдений и более, причем значительную часть периода активности составляет перемещение, хотя и более вялое, чем в норме. С увеличением концентрации CO_2 до 90 % период активности существенно сокращается: с 300—500 сек до 15—50 сек, пропорционально сокращается период перемещения и время до наступле-

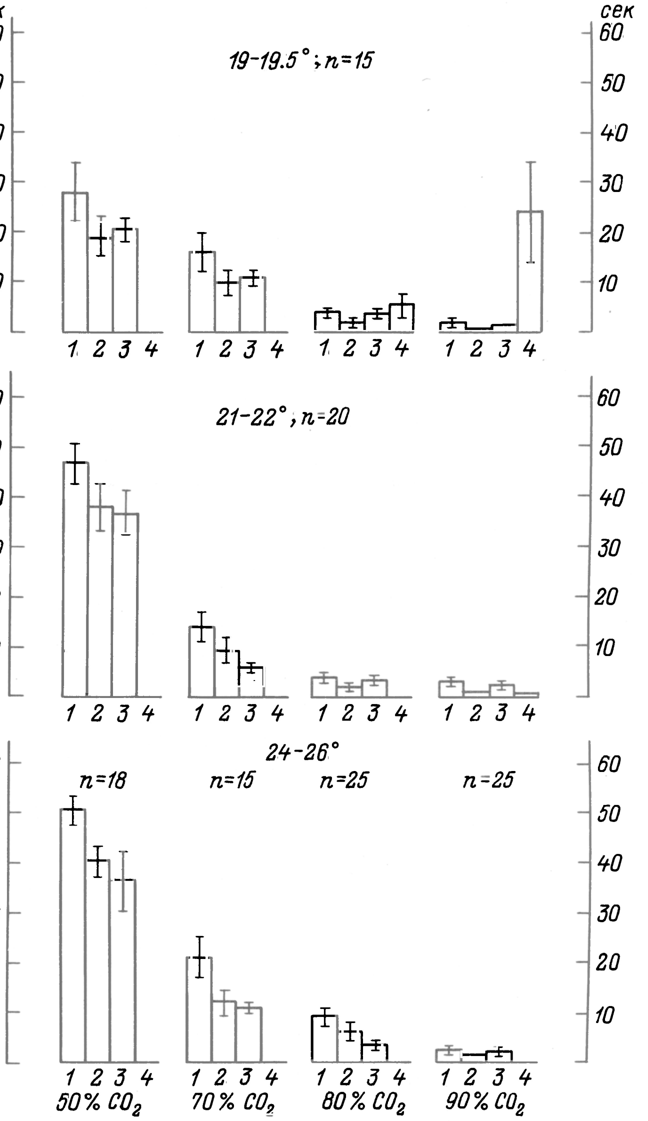


Рис. 1. Действие углекислого газа на природных самок *Ixodes persulcatus*.

1 — длительность периода активности; *2* — длительность периода движения; *3* — время наступления, анестезии; *4* — время выхода из анестезии; для *1*—*3* — шкала слева, для *4* — шкала справа.

ния первого неактивного состояния. Выявлена четкая зависимость реакции клещей на CO_2 не только от концентрации газа, но и от температуры: с увеличением температуры анестезирующее действие углекислоты ослабевает. Так, при 50 % CO_2 и 19—19.5° были активны в течение всего срока наблюдений 20 % самок, при 20—21° — 45 и при 24—26° — 50 %.

При 50 и 70 % CO_2, видимо, ни одна самка не была в состоянии глубокой анестезии, так как все клещи после прекращения действия газа сразу же начинали двигаться. Глубокая анестезия отмечена при 19—19.5° и 80 % CO_2 у 33 % самок, при 90 % CO_2 и той же температуре — у 73 % самок, а при 90 % CO_2 и 20—21° — лишь у 28 % самок. При температуре 24—26° ни одна самка не достигла состояния глубокой анестезии.

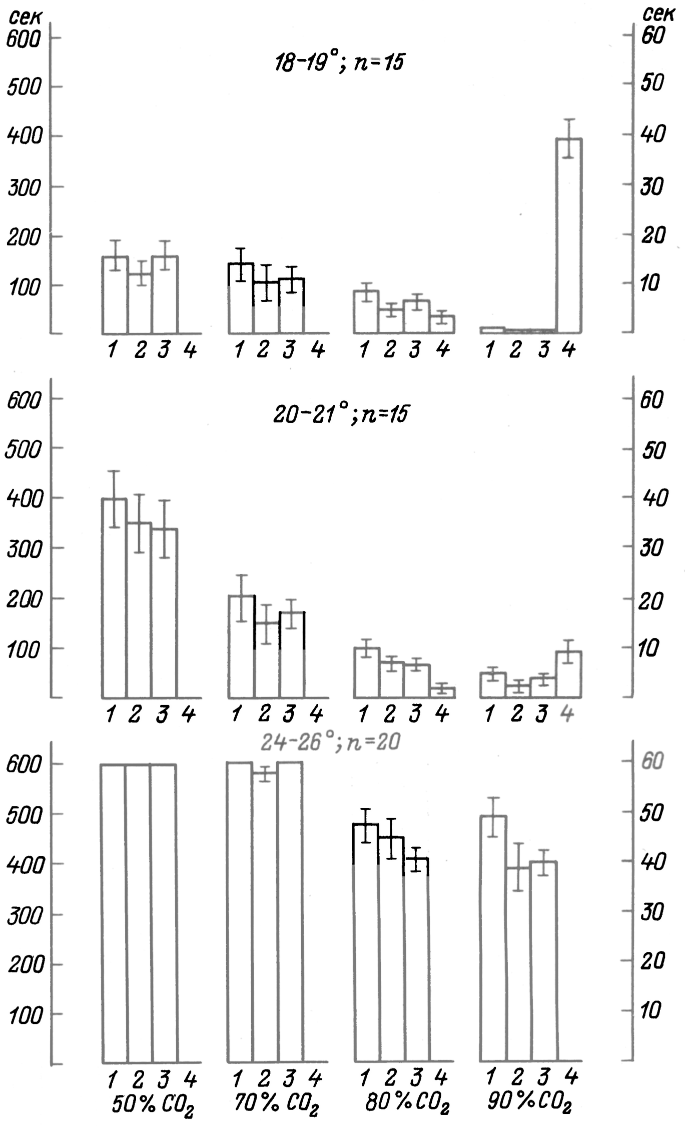


Рис. 2. Действие углекислого газа на природных самцов *Ixodes persulcatus*.
Обозначения такие же, как на рис. 1.

Самцы оказались более устойчивы к углекислоте, чем самки (рис. 2). Так, при 24—26° все особи в 50 и 70 %-ной атмосфере CO_2 сохраняли активность в течение всего срока наблюдений (600 сек) и все, кроме одного, весь этот срок перемещались по камере. Лишь при 80 и 90 % CO_2 и низких температурах реакция самцов приближалась к реакции самок, а при 24—26° самцы сохраняли активность значительно дольше, около 75 % срока наблюдений и перемещались по камере шприца около $^2/_3$ времени.

Глубокая анестезия отмечена при 18° у 14 % самцов в 70 % CO_2, у 33 % — в 80 % и у всех особей в 90 %-ной атмосфере CO_2. При 20—21° анестезия отмечена у 1 самца из 15 в 80 % и у 55 % — в 90 % CO_2. Таким образом, у самцов, в целом более устойчивых к действию углекислоты, чем самки, бо́льшая доля

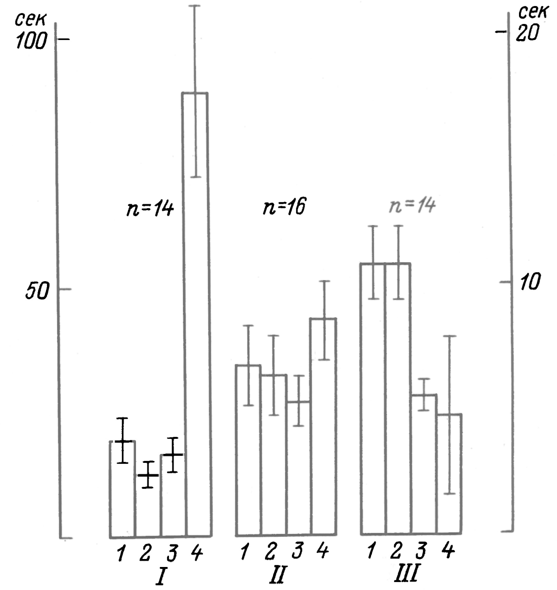


Рис. 3. Действие 70 %-ного углекислого газа на «зимовавших» и «незимовавших» нимф таежного клеща *Ixodes persulcatus* I лабораторного поколения.

I — нимфы до «зимовки» в холодильнике, 22°; *II* — нимфы после «зимовки» в холодильнике, 21—22°; *III* — нимфы после «зимовки» в холодильнике, 23°.
Остальные обозначения такие же, как на рис. 1.

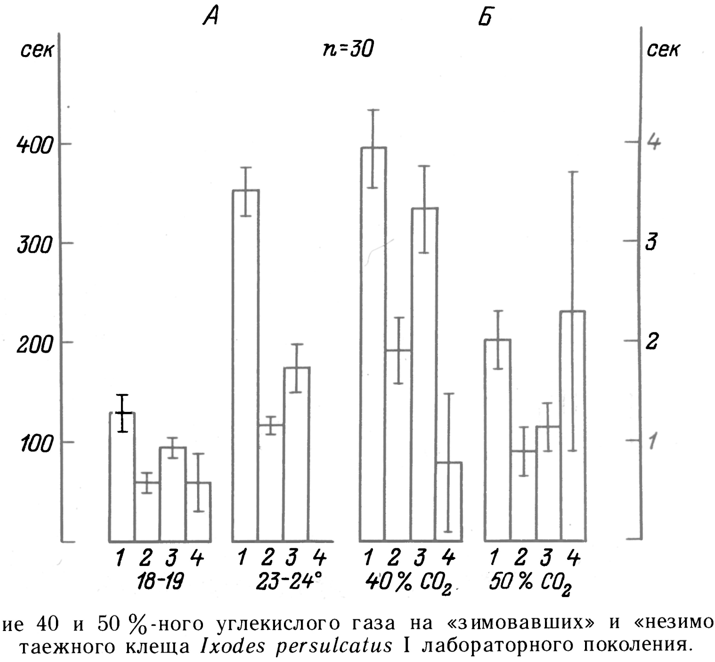


Рис. 4. Действие 40 и 50 %-ного углекислого газа на «зимовавших» и «незимовавших» нимф таежного клеща *Ixodes persulcatus* I лабораторного поколения.

А — нимфы до зимовки, 40 % CO_2; *Б* — нимфы после зимовки, 23—24 °C.
Остальные обозначения такие же, как на рис. 1.

особей достигает состояния глубокой анестезии и им требуется большее время для выхода из нее по окончании действия CO_2.

Ixodes persulcatus, нимфы F_1. Исследование нимф проводилось с целью выявить различия в реакции «зимовавших» и «незимовавших» особей на CO_2 (первая серия опытов) и особенности реакции нимф на разные концентрации CO_2 при разной температуре (вторая серия). Условия и результаты первой серии опытов представлены на рис. 3 и 4. Было выяснено, что нимфы до «зимовки» более чувствительны к действию CO_2: у них короче длительность периода активности, длительность периода движения, раньше наступает анестезия. Но различия эти достоверны в трех случаях из 6 пар сравнений. Время выхода из анестезии при воздействии 70 % CO_2 достоверно выше у «незимовавших» нимф. При 40 % CO_2 и 23—24° среди «незимовавших» нимф ни одна не достигла состояния

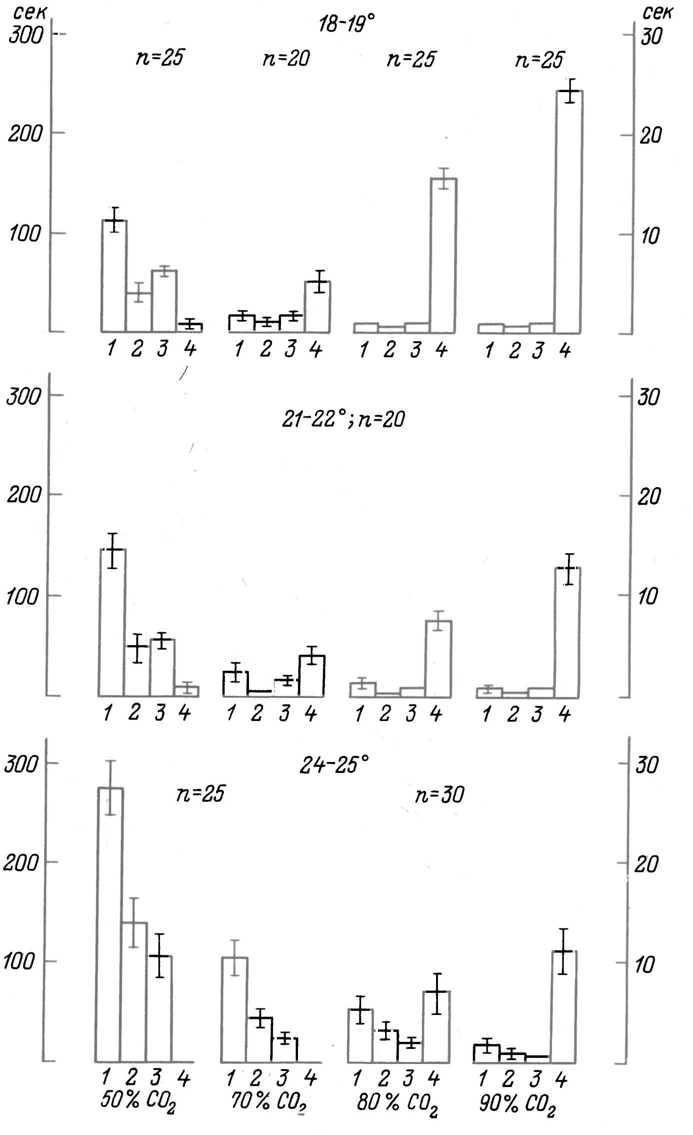


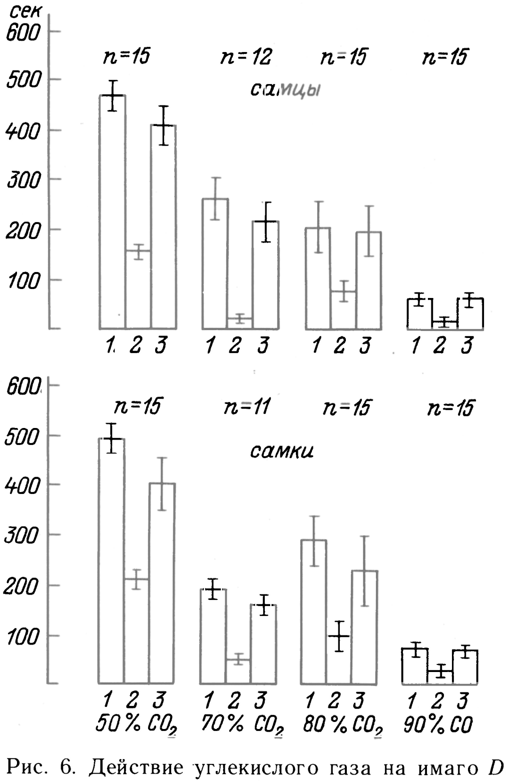
Рис. 5. Действие углекислого газа на «зимовавших» нимф I лабораторного поколения.

глубокой анестезии, а среди «зимовавших» — 2 из 30. Таким образом, «незимовавшие» нимфы оказались (по группе оценок) чуть более чувствительны к воздействию углекислого газа, чем «зимовавшие».

Вторая серия опытов с разными концентрациями CO_2 в трех диапазонах температур выявила те же тенденции в реакции нимф, что и у имаго: уменьшение чувствительности нимф к углекислоте с уменьшением концентрации газа и увеличением температуры (рис. 5). Но нимфы оказались чувствительнее по трем параметрам в 3—4 раза. Глубокая анестезия в атмосфере CO_2 с концентрацией 50, 70, 80 и 90 % отмечена при 18—19° — у 12, 80, 100 и 100 % нимф, при 21—22° — у 15, 80, 85 и 95 % и при 24—25 °C — у 0, 0, 50 и 67 % нимф соответственно.

Dermacentor reticulatus, имаго. Имаго F_1 этого вида под воздействием CO_2 дольше сохраняли активность, чем самки таежного клеща (ср. рис. 1 и 6), но меньше перемещались по камере.

Сравнение реакции имаго из природы с реакцией клещей первого лабораторного поколения выявило несколько большую чувствительность лабораторных клещей (рис. 7). При 70 % CO_2 у них был короче период активности, период перемещения, раньше наступал период неактивности. У самцов различия были достоверны только по длительности периода перемещения, а у самок — по всем



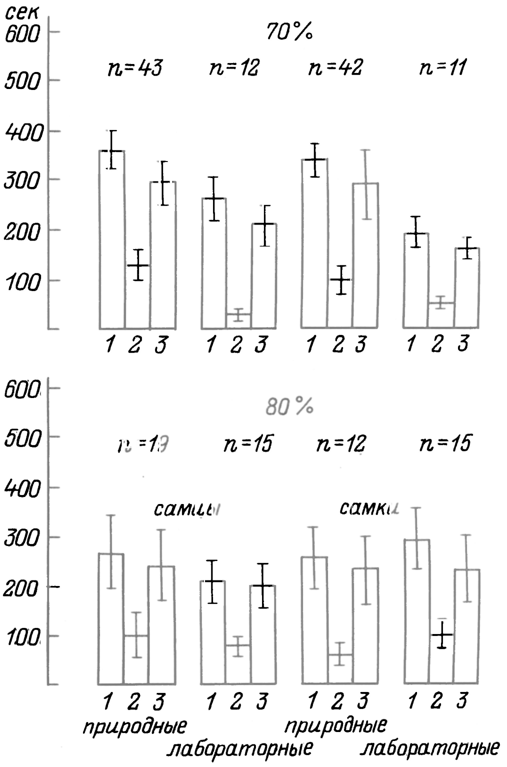


Рис. 6. Действие углекислого газа на имаго *Dermacentor reticulatus* I лабораторного поколения при 24°.

Обозначения такие же, как на рис. 1.

Рис. 7. Действие углекислого газа на имаго *Dermacentor reticulatus* из природы и I лабораторного поколения.

Обозначения такие же, как на рис. 1.

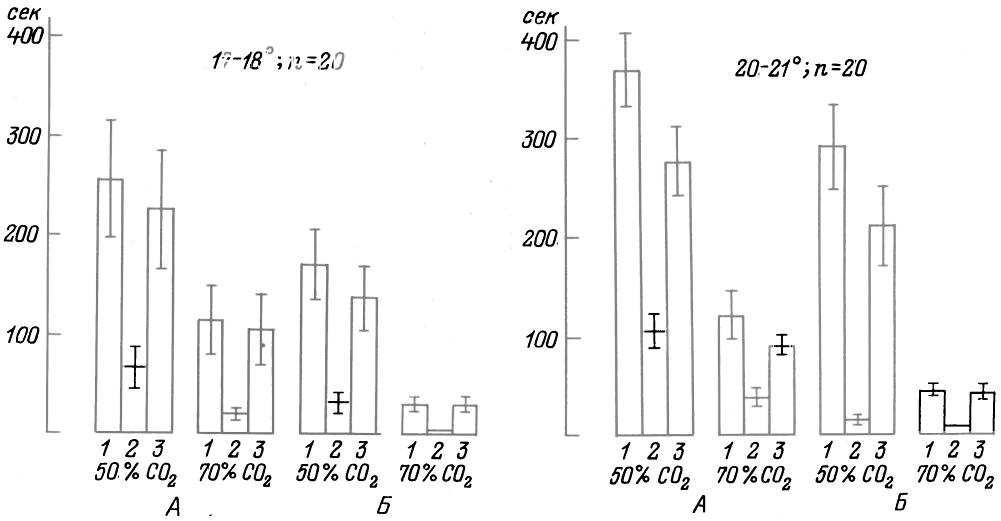


Рис. 8. Действие углекислого газа на природных самок *Dermacentor reticulatus* (*А*) и *D. marginatus* (*Б*).

Обозначения такие же, как на рис. 1.

трем параметрам. При 80 % CO_2 сохранилась та же тенденция, но различия были недостоверны.

D. reticulatus, нимфы F_1. В нарастающих концентрациях CO_2 (50, 70, 80 и 90 %) при температуре 20—21° все нимфы сохраняли активность в течение всего срока наблюдений, но длительность периода перемещения быстро сокращалась с 284 до 19, 15 и 7 сек соответственно. Повышение температуры ведет к увеличению времени перемещения нимф: при 24° и 80 % CO_2 длительность перемещения возросла в 7 раз — с 15 до 106 сек.

Несмотря на то что все нимфы в опыте сохраняли признаки активности весь срок наблюдений, по окончании опыта многие из них не сразу начинали движение даже под воздействием дыхания. Это свидетельствует о том, что признак «время выхода из анестезии» для клещей рода *Dermacentor* непригоден, хотя по средним оценкам для каждой группы имаго этого рода время выхода из анестезии тем больше, чем короче период активности, так же как и у таежного клеща.

D. marginatus, самки из природы. Исследовано 20 клещей весеннего отлова после 3.5 мес. экспозиции в холодильнике в двух диапазонах температур с двумя концентрациями CO_2 (рис. 8). Опыты ставили с интервалом в 1—2 дня. Результаты опытов показали ту же зависимость характера реакции от концентрации CO_2 и температуры, что и у других видов. Но самки *D. marginatus* оказались чувствительнее к CO_2, чем *D. reticulatus*.

Индивидуальная реакция клещей на углекислоту. Индивидуальную реакцию клещей на углекислоту проверяли на самках *D. reticulatus* и *D. marginatus* из природы в четырех вариантах условий (рис. 8) и на двух группах нимф таежного клеща первого лабораторного поколения, которых исследовали до «зимовки» и после «зимовки» — в двух вариантах условий каждую (рис. 4). Во всех случаях клещам присваивали индивидуальный номер и содержали в пробирках по одному.

Во всех опытах реакция клещей по средним для группы оценкам соответствовала описанной выше для этих видов. Однако реакция отдельных особей на CO_2 не была строго индивидуальной, а менялась от опыта к опыту. Клещи, наиболее активные в одних условиях, могли оказаться среди наименее активных при других — в следующем опыте. Мы рассчитали коэффициент корреляции и ранговый коэффициент корреляции Спирмена для индивидуального поведения самок *D. marginatus* и *D. reticulatus* в одном варианте опытов с каждым из трех других. Были взяты 3 параметра: длительность периода активности, длительность периода движения и время наступления анестезии. Ни в одном случае из 18 пар сравнений коэффициенты не выявили достоверной связи. Для двух вариантов опыта с нимфами таежного клеща (при разных концентрациях CO_2 и одинаковой температуре и при разных температурах, но одной концентрации CO_2) коэффициенты корреляции также не выявили достоверной связи по тем же параметрам.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами материалы позволяют предположить, что характер реакции клещей на углекислый газ тесно связан с механизмом поддержания водного баланса в организме клеща и с дыханием. При закрытом атриальном клапане, изолирующем трахейную систему от окружающей среды (Rudolph, Knülle, 1979), потеря влаги происходит за счет испарения через кутикулу и выделения слюны. При открытом клапане потери воды резко возрастают за счет испарения через стигмы, если влажность воздуха ниже равновесной (Lees, 1946) или критической равновесной (Knülle, Wharton, 1964; Hafez a. o., 1970). У клещей *Amblyomma variegatum*, находящихся в покое, стигмы открывались 1—2 раза в час на 4—7 мин, у клещей подвижных — до 15 раз в час (Rudolph, Knülle, 1979). Углекислота в высоких концентрациях вызывает открывание атриального клапана, о чем можно было судить по резкому увеличению потери влаги (Mellanby, 1935; Browning, 1954; Hefnawy, 1970; Rudolph, Knülle, 1979) или по реакции на пары циана. Клещи *Hyalomma dromedarii* и *Ornithodoros savignyi*, помещенные в пары циана, оставались живы до 12 ч (срок наблюдений). Но после 3-минутной выдержки в CO_2 погибали в парах циана за 10—15 мин (Hefnawy, 1970). Углекислый газ в концентрации, вызывавшей увеличение потерь влаги, одновременно оказывал на клещей анестезирующее действие (Browning, 1954). О том, что углекислота вызывает именно анестезию, а не асфиксию свидетельствуют данные цитированного автора, а также наши данные. Мы поместили 5 самок *D. reticulatus* в камеры с биологически нейтральным газом — азотом и 5 нимф таежного клеща — в камеры с азотом и смоченными водой тампонами. Клещи остались живы при температуре 18—20° после 10 сут экспозиции (срок наблюдений).

Таким образом, согласно литературным данным, CO_2 в высоких концентрациях вызывает открывание атриального клапана (и тем самым доступ CO_2 через стигмы в трахейную систему) и последующую анестезию. Наши материалы показывают, что воздействие CO_2 на клещей несколько сложнее. В первые секунды углекислота, видимо, активизирует клещей. По крайней мере имаго рода *Dermacentor*, находящиеся в состоянии покоя (с согнутыми и поджатыми под вентральную сторону тела ногами), после помещения в атмосферу CO_2 обычно сразу начинали двигаться. Затем наступали признаки анестезии — у разных видов и особей в разные сроки. По средним для группы оценкам анестезия наступает тем скорее, чем выше концентрация углекислого газа и чем ниже температура. Такое влияние температуры на первый взгляд кажется неожиданным. Объясняется оно, видимо, тем, что при высокой температуре, когда выше скорость испарения, клещи для уменьшения потерь влаги держат атриальный клапан закрытым большую часть времени, изолируя таким образом трахейную систему от внешней среды и, следовательно, действия углекислого газа. Открывание атриального клапана в ответ на воздействие углекислотой при высоких температурах или необязательно для всех особей, или клапан открывается на сравнительно короткое время, недостаточное для полной анестезии клещей.

При низких температурах, когда испарение значительно ниже, атриальный клапан, видимо, значительную часть времени открыт и CO_2 имеет более свободный доступ в трахейную систему. Поэтому при низких температурах анестезия наступает быстрее. Возможно параллельное влияние и другого механизма. Углекислый газ очень хорошо растворяется в воде, но его растворимость зависит от температуры: 1.845 г на 1 л воды при 17° и 1.449 г на 1 л — при 25°. Следовательно, от температуры зависит скорость и пределы насыщения гемолимфы и тканей клеща углекислотой.

Чтобы выяснить, какой механизм доминирует, мы воздействовали углекислотой в концентрации 50 % при 20—21° на самок *D. reticulatus*, предварительно выдержанных в течение 2 сут в 0 % и 100 % влажности. Результаты наблюдений подтвердили ведущую роль механизма запирания трахейной системы: подсушенные клещи гораздо меньше реагировали на углекислоту, чем особи, выдержанные во влажной камере. При этом обе группы давали меньший разброс в оценках, чем клещи из пробирок дифференцированной влажности (рис. 9).

Однако и в этих случаях разброс был значителен. Выше мы упоминали, что частота открывания атриального клапана у клещей зависит от их подвижности (Rudolph, Knülle, 1979). Кроме того, на *Amblyomma variegatum* показано, что даже при постоянно высокой влажности (93 %), превышающей критическую равновесную (80—85 %), у клещей периоды потери воды чередуются с периодами ее восстановления. Периоды потери влаги (6—10 ч и 8—14 сут) длиннее периодов восстановления (3—6 ч и 2—6 сут) и индивидуальны для каждой особи (Knülle, Rudolph, 1982).

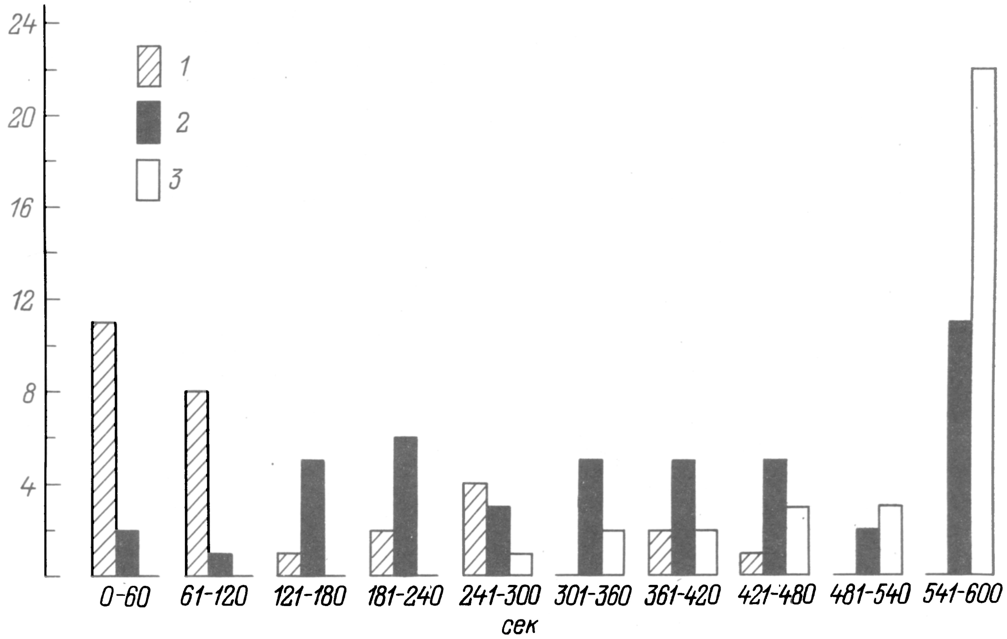


Рис. 9. Распределение природных самок *Dermacentor reticulatus* по длительности периода активности в 50 %-ной атмосфере CO_2 при 20—21°.

Клещей в течение 2 сут перед опытом выдерживали: *1* — при 100 % влажности, *2* — в пробирках дифференцированной влажности, *3* — при 0 % влажности.

Известно (Балашов, 1967), что уровень водного баланса определяет поведенческие реакции клещей, прежде всего реакции, связанные с поисковым поведением (реакция на хозяина, геотаксис). Приведенные выше литературные данные и наши материалы свидетельствуют о гетерогенности популяций клещей по уровню водного баланса. Особенно высока гетерогенность при влажности, не достигающей критической равновесной. Различия в реакции клещей на воздействия (в частности, на CO_2), связанные с различиями водного баланса, значительны и маскируют те, которые могут возникнуть из-за других причин, в том числе и из-за влияния зараженности возбудителями на физиологическое состояние переносчика.

Из этого следует, что при изучении реакции клещей на различные стимулы, определяющие поисковое поведение, и при выявлении различий в поведении зараженных и незараженных особей необходимо максимально возможное выравнивание опытной и контрольной партий клещей по уровню водного баланса для уменьшения разброса оценок. Этого можно достичь предварительным выдерживанием клещей при 100 % влажности.

Литература

Балашов Ю. С. Кровососущие клещи (Ixodoidea) — переносчики болезней человека и животных. Л.: Наука, 1967. 320 с.

Browning T. O. Water balance in the tick Ornithodoros moubata Murray, with particular reference to the influence of carbon dioxide on the uptake and loss of water // J. Exp. Biol. 1954. Vol. 31, N 3. P. 331—340.

Hafez M., El-Ziady S., Hefnavy T. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Uptake of water vapor by the different developmental stages of Hyalomma (H.) dromedarii Koch (Ixodidae) and Ornithodoros (O.) savignyi (Audouin) (Argasidae) // J. Parasitol. 1970. Vol. 56, N 2. P. 354—361.

Hefnavy T. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Water loss from the spiracles of Hyalomma (H.) dromedarii Koch (Ixodidae) and Ornithodoros (O.) savignyi (Audouin) (Argasidae) // J. Parasitol. 1970. Vol. 56, N 2. P. 362—364.

Knülle W., Rudolph D. Humidity relationships and water balance of ticks // Physiology of ticks (Current themes in tropical science, vol. 1). Oxford: Perg. Press, 1982. P. 43—70.

Knülle W., Wharton G. W. Equilibrium humidities in arthropods and their ecological significance // Proc. 1-st Int. Congr. Acarology. Acarologia. 1964. Vol. 6, N 1. P. 299—306.

Lees A. D. The water balance in Ixodes ricinus L. and certain other species on ticks // Parasitology. 1964. Vol. 37, N 1. P. 1—20.

Mellanby K. The structure and function of the spiracles of the tick Ornithodoros moubata Murray // Parasitology. 1935. Vol. 27, N 2. P. 288—290.

Rudolph D., Knülle W. Mechanisms contributing to water balance in non-feeding ticks and their ecological implications // Recent advances in acarology. Vol. 1. N.-Y.: Acad. Press. 1979. P. 375—383.

Turell M. J., Hardy J. L. Carbon dioxide sensitivity of mosquitoes infected with California encephalitis virus // Science. 1980. Vol. 209. P. 1029—1030.

ИМПиТМ им. Е. И. Марциновского,
Москва

Поступила 7.01.1988

THE EFFECT OF CO_2 HIGH CONCENTRATIONS ON IXODID TICKS

R. L. Naumov, V. P. Gutova

SUMMARY

The ticks *Ixodes persulcatus, Dermacentor reticulatus, D. marginatus* were affected by 50, 70, 80 and 90 % CO_2 at 18 to 26°. The higher the gas concentration and the lower the temperature, the quicker and the deeper was anesthesia. Additional tests have shown that response to CO_2 depends on the water balance level determining the position of atrial valves. The response of some individuals to CO_2 can change depending on the tick state during the experiment.